

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12N 15/83, 15/11, C12P 21/02 // C12N 5/10, A01H 1/00 A01N 3/00 (C12P 21/02 C12R 1:92) (C12N 5/10 C12R 1:92)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 93/20217</p> <p>(43) 国際公開日 1993年10月14日 (14.10.1993)</p>								
<p>(21) 国際出願番号 POT/JP93/00408 (22) 国際出願日 1993年3月31日 (31. 03. 93)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平4/108628</td> <td>1992年3月31日 (31. 03. 92)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平4/188744</td> <td>1992年6月22日 (22. 06. 92)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平4/351970</td> <td>1992年12月8日 (08. 12. 92)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘紡株式会社 (KANEBO LIMITED) (JP/JP) 〒131 東京都墨田区墨田五丁目17番4号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</p> <p>濱本 宏 (HAMAMOTO, Hiroshi) (JP/JP) 〒250 神奈川県小田原市寿町4丁目3番32号 Kanagawa, (JP)</p> <p>杉山 義宣 (SUGIYAMA, Yoshinori) (JP/JP) 中川 典昭 (NAKAGAWA, Noriaki) (JP/JP) 橋田 英児 (HASHIDA, Eiji) (JP/JP) 〒250 神奈川県小田原市寿町5丁目12番13号 Kanagawa, (JP)</p> <p>土本 卓 (TSUCHIMOTO, Suguru) (JP/US) 10021・ニューヨーク・ニューヨーク・63ストリート・ イースト504・13S New York, (US)</p> <p>中西 規之 (NAKANISHI, Noriyuki) (JP/JP) 〒228 神奈川県座間市広野台1丁目5040番4号 Kanagawa, (JP)</p> <p>松永 祐士 (MATSUNAGA, Yuji) (JP/JP) 〒250-01 神奈川県南足柄市岩原171番地 Kanagawa, (JP)</p>	特願平4/108628	1992年3月31日 (31. 03. 92)	JP	特願平4/188744	1992年6月22日 (22. 06. 92)	JP	特願平4/351970	1992年12月8日 (08. 12. 92)	JP	<p>岡田 吉美 (OKADA, Yoshimi) (JP/JP) 〒270 千葉県松戸市常盤平2丁目6番14号 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 宇井正一, 外 (UI, Shoichi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 育和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平4/108628	1992年3月31日 (31. 03. 92)	JP								
特願平4/188744	1992年6月22日 (22. 06. 92)	JP								
特願平4/351970	1992年12月8日 (08. 12. 92)	JP								
<p>(54) Title : PLANT VIRUS VECTOR, PLASMID, METHOD OF EXPRESSING FOREIGN GENE, AND METHOD OF ACQUIRING FOREIGN GENE PRODUCT</p>										
<p>(54) 発明の名称 植物ウィルスベクター、プラスミド、外来遺伝子発現方法及び外来遺伝子産物の取得方法</p>										
<p>(57) Abstract</p>										
<p>A plant virus vector comprising a coat protein gene of a tobacco mosaic virus and a foreign gene joined to the downstream of the above gene via a sequence that induces read-through; a plasmid providing the vector as a transcript; a method of expressing a foreign gene in a plant body by inoculating the vector in a plant; and a method of efficiently acquiring a foreign gene product, produced in a plant body, in the form of virus particles.</p>										

(57) 要約

本発明は、タバコモザイクウィルスの外被タンパク質遺伝子の下流に、リードスルーを誘起する配列を介して外来遺伝子が接続されている植物ウィルスベクター、及び転写物として該ベクターを提供するプラスミド、並びに該ベクターを植物に接種して外来遺伝子を植物体中で発現させる方法に関する。

またさらに、植物体中に産生した外来遺伝子産物をウィルス粒子として効率良く取得する方法に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コートジボワール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チェッコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ヴェトナム
FI	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

明 細 書

植物ウィルスベクター、プラスミド、外来遺伝子発現方法及び外来遺伝子産物の取得方法

技術分野

本発明は、植物ウィルスベクターによる外来遺伝子の植物体への導入と、植物の性質の改良及び植物体全体における外来遺伝子の発現と、その外来遺伝子産物を簡便に効率良く取得する方法に関する。

背景技術

トバモウィルス等に代表されるある種の植物ウィルスは、植物体に感染すると、その植物体内で増殖し、外被タンパク質と呼ばれるタンパク質を大量に作りながら、植物体内で急速に拡がって行くことが知られている。

すでに、これらの植物ウィルスを用いた遺伝子操作系が幾つか構築されており、この系を用いて外来遺伝子を植物体内へ導入する試みがなされている。例えば外被タンパク質遺伝子と外来遺伝子を置換する方法〔Takamatsu N., Ishikawa M., Meshi T. and Okada Y., ENBO J., 6, 307-311 (1987)〕, 或いは外被タンパク質遺伝子と外来遺伝子を直結して融合タンパク質を作らせる方法〔Takamatsu N., Watanabe Y., Yanagi H., Meshi T. et al., FEBS Lett., 269, 73-76 (1990).〕等である。

しかし、これら公知の方法で用いられている植物ウィルスベクターはいずれも、植物個体全体に拡がる能力（全身感染性）を持たないという、大きな欠点を有しており、植物個体全体に有用な性質を導入したり、植物個体全体で有用タンパク質を生産することは、不

可能であった。

植物ウィルスが全身感染性を示す為には、野生型外被タンパク質による粒子形成が必要である〔T.Saito et al., Virology, 176, 329 (1990)〕。既存の植物ウィルスベクターは、外被タンパク質が産生されなかったり（置換型ベクター）、外被タンパク質が融合タンパク質となっており、その性質が大きく変化してしまったり（直結型ベクター）する為、粒子形成をすることができず、全身感染性を示さなかったものと考えられる。

またさらに、既存の植物ウィルスベクターを用いて外来遺伝子を発現させた場合、外来遺伝子を導入した植物体から外来遺伝子産物のみを簡便に効率よく分離、精製することは非常に困難である。

なぜならば、分離、精製の目標である（１）簡単な装置と経済性、（２）高い回収率、（３）高い純度、（４）良好な再現性、を達成するためには、分別沈澱、脱塩、濃縮、各種クロマトグラフィーを行うなど数種類の操作の組み合わせが必要不可欠であるが、これら一連の操作は、通常半月から一ヵ月にも及ぶ多大な時間と労力を必要とすることが多いからである。仮に簡便、迅速であったとしても植物体中には外来遺伝子産物と分子量、等電点、溶媒に対する親和性などの諸性質が類似するタンパク質が共存するため、これらと外来遺伝子産物とを分離するには各種の分離、精製工程における外来遺伝子産物の損失を回避することは難しい。それ故、外来遺伝子産物の高い回収率は望めない。

発明の開示

従って本発明の目的とするところは、植物体全体への感染性（全身感染性）を有する植物ウィルスベクター、転写物として該植物ウィルスベクターを提供するプラスミド、及び該植物ウィルスベクタ

ーを植物体に接種することによって外来遺伝子を植物体全体に発現させる方法を提供することにある。

またさらに、植物体中に産生した外来遺伝子産物を簡便に効率良く取得する方法を提供することにある。

本発明者等は上述の目的を達成するために鋭意研究した結果、植物ウィルスの外被タンパク質遺伝子の下流に、リードスルーを誘起する塩基配列〔J.M. Skuzeskiら、J. Mol. Biol. 218, 365-373(1991)〕を介して外来遺伝子が接続されている植物ウィルスベクターの利用、該植物ウィルスベクターを転写産物とするプラスミドの利用、及び該植物ウィルスベクターを植物体に接種し、外来遺伝子を植物体中で発現させる方法により植物体全体の感染（全身感染性）が可能となり、植物個体全体に有用な性質を導入したり、植物個体全体で有用タンパク質を生産することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

またさらに、植物体から外来遺伝子産物を取得するに際し、ウィルス粒子として植物体より採取することにより外来遺伝子産物を簡便に効率良く取得できることを見出し、本発明を完成するに至った。

以下、本発明の構成について詳説するが、それに先立ち本明細書中で用いた用語について説明する。

植物ウィルスベクター；植物ウィルスの持つDNA或いはRNA配列に、外来遺伝子を導入することによって得られる複製可能な組換え体。

リードスルー；RNAからタンパク質への翻訳において、終止コドンで翻訳がストップせず、時として次の終止コドンまで翻訳されてしまう現象。リードスルーされる終止コドンの近傍の塩基配列によって起きる。

植物体；植物個体（葉、莖、根からなる植物。）の他、植物細胞、

カルス、プロトプラスト、カルスより誘導した不定芽、不定根、不定胚等を含むものであって、本発明において植物ウイルスの宿主となるものである。

野生型外被タンパク質；植物ウイルスの粒子形成に必須なタンパク質を意味する。通常単に外被タンパク質と呼ばれているが、本発明においては下記の融合タンパク質中の外被タンパク質と区別するため、あえて野生型外被タンパク質と記載する。

融合タンパク質；外被タンパク質の下流に外来遺伝子産物が結合したもの或いは外被タンパク質の一部を外来遺伝子産物で置換したものである。

ウイルス粒子；ウイルスゲノムが外被タンパク質により覆われたものである。

本発明に用いられる植物ウイルスとしては、カリモウイルス、ジェミニウイルス等のDNAウイルスに属するグループ、トバモウイルス、プロモウイルス及びククモウイルス等のRNAウイルスに属するグループが挙げられる。具体的なウイルス種としては、カリモウイルスに属するカリフラワーモザイクウイルス、ジェミニウイルスに属するトマトゴールデンモザイクウイルス、トバモウイルスに属するタバコモザイクウイルス、プロモウイルスに属するプロムモザイクウイルス、ククモウイルスに属するキューカンバーモザイクウイルス等が挙げられる。

本発明に用いられる外来遺伝子としては、薬理、生理活性を有するペプチド遺伝子や、植物にストレス耐性、病害虫耐性を与えるタンパク質遺伝子、植物の形態や花色を変化させるタンパク質遺伝子等があり、具体的には、エンケファリン、カルシトニン、コルチコトロピン、ヒト上皮細胞成長因子（EGF）や、第1表に示したような、血圧低下作用を持つ、アンジオテンシン転換酵素阻害

(ACEI) ペプチド等をコードする遺伝子等が挙げられる。

第1表

CEI₁₂ : Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys

CEI_{β7} : Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg

CEI₆ : Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp

CEI₅ : Phe-Phe-Val-Ala-Pro

これらの遺伝子は、生物のゲノムDNAやcDNA、或いはプラスミドDNA等から得ることができるが、DNA合成機等を用いて合成することもできる。

本発明に用いられるリードスルーを誘起する塩基配列とは、リードスルー現象を引き起こす塩基配列ならばその種類は問わないが、例えばタバコモザイクウィルスの130/180Kと呼ばれるタンパク質遺伝子中に存在する塩基配列等のような天然に存在する塩基配列の他、それらの塩基配列の一部を置換したものであっても良い。

具体的には、タバコモザイクウィルスの130/180Kタンパク質遺伝子中に存在するUAGCAAUUA、又はそのDNA型に相当するTAGCAATTA（下線部は終止コドンである。）、あるいは終止コドン进行他の終止コドンに置換えたUAACAAUUA（TAACAAATTA）、UGACAAUUA（TGACAAATTA）、もしくは終止コドン以外の塩基配列を置換したUAGCARYYA（TAGCARYYA）（RはA又はG、YはC又はUあるいはTを表す。）等が挙げられるが、中でもUAGCAAUUA（TAGCAATTA）が、リードスルー効率が良いという点で好ましい。

本発明に用いられる植物ウィルスの外被タンパク質遺伝子としては、天然に存在する遺伝子の他、その一部の塩基配列を欠失させたもの、又は一部の塩基配列を置換した遺伝子でも良いが、特にリー

ドスルーを誘起する塩基配列の直前の塩基がAである外被タンパク質遺伝子が、リードスルー効率の点で好ましい。

塩基配列の置換を具体的に示すと、タバコモザイクウィルスの場合、外被タンパク質遺伝子の3'末端のU(T)のAへの置換あるいは3'末端のUCU(TCT)のCAAへの置換等が挙げられ、これらの置換はリードスルー効率が著しく向上するという点で好ましい。

本発明において用いられるプラスミドとしては、植物ウィルスがRNAウィルスの場合は、例えば試験管内転写用のプロモーターとしてPMプロモーター [Ahlgquist, P. and Janda M., Mol. Cell. Biol., 4, 2876-2882(1984)] を持つpLFW3 [Meshi T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5043 (1986)], T7プロモーター [Rosa, M. D., Cell, 16, 815-825(1979)] を持つpTLW3 [Meshi T., Watanabe Y. and Okada Y., in: Genetic Engineering with Plant Viruses., Wilson, T.M.A. and Davis, J.W. (Eds.), CRC, Florida, USA., p154 (1992)] 等が挙げられるが、植物ウィルスがDNAウィルスの場合は、試験管内転写用のプロモーターを持たないプラスミドでよい。

本発明の植物ウィルスベクターは、ウィルスがRNAの場合は例えば次のようにして作成することができる。

まず、植物RNAウィルスのcDNAを、試験管内転写用プロモーターを有するプラスミドのプロモーター下流に組み込む。次に、遺伝子操作において通常用いられる手法に従い、植物ウィルス由来の外被タンパク質遺伝子の下流に、リードスルーを誘起する塩基配列を介して目的とする外来遺伝子を組み込む。

この時、外来遺伝子に起因するタンパク質(又はペプチド)を単離し易いように、リードスルーを誘起する塩基配列と外来遺伝子と

の間に、タンパク質分解酵素等が認識するアミノ酸をコードする塩基配列を挿入しておくのが好ましい。タンパク質分解酵素が認識するアミノ酸としては、例えばアルギニンおよびリジン（トリプシンにより開裂）、フェニルアラニンおよびチロシン（キモトリプシンにより開裂）、並びにメチオニン（プロムシアンにより化学的に分解）が挙げられる。

次に、構築した上記のプラスミドから、試験管内転写反応によって、RNAを作成し、植物ウィルスベクターとする。又、本発明の植物ウィルスベクターは、更に試験管内で野生型ウィルスの外被タンパク質と粒子形成させたもの（植物ウィルスベクター粒子）であってもよい。

ウィルスがDNAの場合は、DNAウィルスを直接プラスミドに組み込み、遺伝子操作を行う。遺伝子操作を行ったプラスミドからDNAウィルス部分を切り出す方法等によって、植物ウィルスベクターを作成することができる。

上述のようにして得られた植物ウィルスベクターは、RNA又はDNAの形で、或いはRNAの場合は好ましくは粒子形成させた形で、例えばカーボランダムとともに葉に摺り込んだり、カーボランダムとともに植物体に噴霧する方法等で、簡単に植物体に感染させることができる。

この場合の植物体としては、本発明の植物ウィルスベクターが感染するものであれば、その種類を問わないが、例えばベクターとして用いるウィルスがタバコモザイクウィルスの場合は、タバコ、トマト、トウガラシ等のナス科植物、プロムモザイクウィルスの場合は、コムギ、オオムギ等のイネ科植物、カリフラワーモザイクウィルスの場合は、カリフラワー、カブ等のアブラナ科植物のそれぞれ植物個体や培養細胞を用いることができる。

感染した植物体は、全身において野生型外被タンパク質と融合タンパク質を同時に産生している。すなわち、融合タンパク質の形で外来遺伝子産物が産生されている。

また、感染した植物体からウィルス粒子を回収し、得られた植物ウィルス粒子を分離、精製し分析すると、粒子形成に野生型外被タンパク質と融合タンパク質の両方が使われていることが分かる。

このことは、野生型外被タンパク質との共存下においては、融合タンパク質も粒子形成に用いられることを意味している。従って、植物体から植物ウィルス粒子を回収することによって、外来遺伝子産物を融合タンパク質として取得することができる。得られた融合タンパク質を適当な手段を用いて切断することによって、目的とする外来遺伝子産物を取得することができる。

ウィルス粒子の回収は、高価な試薬を必要とせず、又多くの時間を必要とせず操作は遠心分離のみでほぼ1日で完了する。しかも遠心分離操作の再現性は高く、得られるウィルス粒子の純度は高い。

本発明の植物ウィルスベクターは、リードスルーを誘起する塩基配列を有している為、野生型外被タンパク質と融合タンパク質（外来遺伝子由来の有用タンパク質又はペプチドと外被タンパク質との融合タンパク質）を、同時に産生する。その為、ウィルス粒子形成が正常に行われ、全身感染性を示すと共に、植物体全体において外来遺伝子を発現できる。

また、本発明の方法により、外来遺伝子産物を高純度で、再現性良く、安価で、簡便に分離、精製することができる。

図面の簡単な説明

図1は、プラスミドpTLW3を表す。

図2は、実施例及び比較例において、植物ウィルスベクターを作

成する際に使用した合成DNAの、塩基配列を表す（A及びA'は比較例1，B及びB'は実施例1，C及びC'は実施例2，D及びD'は実施例3）。

図3は、実施例及び比較例においてプラスミド構築に用いたDNA断片の、プラスミドpTLW3中における位置関係を示す。

図4は、（a）は比較例1，（b）は実施例1において作成したプラスミドを表す。

図5は、比較例1及び実施例1～3で行った植物個体への感染実験において、感染葉及び非感染葉中のウィルスベクターの有無を表す。

図6は、比較例1及び実施例1～3で行った植物個体への感染実験において、感染葉及び非感染葉中のACEIの有無を表す。

図7は、本発明のリードスルー型ベクター（実施例1～3）の、融合タンパク質生産能を表す。

図8は、実施例4で行ったミニトマトへの感染実験において、トマト実中のACEIの有無を表す。

図9は、実施例5で行ったウィルス粒子の採取実験において、採取したウィルス粒子の純度を表す。

図10は、実施例5で行ったウィルス粒子の採取実験において、採取したウィルス粒子中の融合タンパク質、及びACEIペプチドの有無を表す。（a）は抗TMVウサギ血清による抗体染色、（b）は、抗ACEIウサギ血清による抗体染色の結果を表す。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例によって本発明を更に詳細に説明する。尚、実施例で用いたプラスミドpTLW3を図1に示す。

実施例 1 ～ 3 および比較例 1.

1) ACEI 配列を組み込んだ転写用プラスミドの作成

(1) ACEI 配列を有する合成 DNA の作成

ABI 社 (Applied Biosystems, Inc.) 380 A 型合成 DNA 機を用いて、0.2 μ m o 1 スケールで、図 2 に示す 8 本の合成 DNA を作成した。A 及び A' は従来の直結型ベクター (比較例 1), B 及び B' はリードスルー型ベクター (実施例 1), C 及び C' は外被タンパク質遺伝子の 3' 末端の 1 塩基を置換したリードスルー型ベクター (実施例 2), D 及び D' は外被タンパク質遺伝子の 3' 末端の 3 塩基を置換したリードスルー型ベクター (実施例 3) に用いるものである。いずれのベクターも、発現した融合タンパク質から、トリプシン消化によって ACEI ペプチドが単離できるように、ACEI 配列の 5' 側にアルギニンをコードする配列を付してある。合成した DNA は、ABI 社 OPC カートリッジによって精製した。

(2) 合成 DNA のリン酸化とアニール

前記 (1) で合成した DNA を 0.1 μ g/ μ l の濃度に調製し、0.2 mM の ATP によってリン酸化し、フェノール処理とエーテル洗浄によって精製した。精製した DNA を 0.02 μ g/ μ l に調製し、A と A', B と B', C と C', D と D' を各々混合して、65 °C で 5 分間処理した。処理後、室温となるまでゆっくりと冷却することによってアニールした。

(3) プラスミド構築の為の断片調製

図 1 で表される公知の文献 [Meshi T. et al., in : Genetic Engineering with plant Viruses., Wilson, T. M. A. and Davis, J. W. (Eds)., CRC, Florida, USA., p154(1992)] に基づいて構築したプラスミド p TLW 3 を、第 2 表に示す制限酵素の組合せにて消化し、各大きさの断片を調製した。尚、p TLW 3 中での各断片

の位置関係を、図 3 に示す。

第 2 表

K p n I / M l u I 断片	7 . 1 k b p
K p n I / S t u I 断片	1 . 2 k b p
S t u I / A v a I I 断片	0 . 5 6 k b p
N s i I / M l u I 断片	0 . 2 k b p

各断片の調製は、アガロース電気泳動による分離の後、GENE CLEANキット（BIO. 101社製）を用い、添付説明書に従って行った。

上記断片のうち、K p n I と M l u I の 7 . 1 k b p 断片については、アルカリホスファターゼ処理を行い、末端のリン酸を除いて、以下の反応に用いた。

（４）プラスミドの構築と調製

前記（２）で作成した、アニールした４種の合成DNA溶液各々を、前記（３）で作成した p T L W 3 に由来する４つのDNA断片溶液とともに、以下の組成にて、15℃で15時間反応させることによって各々結合させ、４種のプラスミドを作成した。得られたプラスミドのうち、２種を図４に示す（a；比較例１，b；実施例１）。

第 3 表

アニールした合成DNA溶液(0.02 μ g/ μ l)	1.0 μ l
Kpn I / Mlu I 断片 (0.001 μ g/ μ l)	9.0 μ l
Kpn I / Stu I 断片 (0.01 μ g/ μ l)	1.5 μ l
Stu I / Acl I 断片 (0.015 μ g/ μ l)	0.5 μ l
Nsi I / Mlu I 断片 (0.005 μ g/ μ l)	0.5 μ l
× 10 結合反応用バッファー	1.5 μ l
T4 リガーゼ (宝酒造 (株) 350Units / μ l)	1.0 μ l
計	15.0 μ l

尚、× 10 結合反応用バッファーの組成を、第 4 表に示す。

第 4 表

× 10 結合反応用バッファー組成	
Tris-HCl (pH=7.6)	660 mM
MgCl ₂	66 mM
DTT	100 mM
ATP	1 mM

反応液をそのまま用いて E. coli・HB101 コンピテントセル〔宝酒造 (株) 製〕を形質転換し、カルベニシリン耐性のコロニーを選抜した。選抜したコロニーの大腸菌から、目的とするプラスミドを抽出・精製した。

2) 試験管内転写反応による植物ウィルスベクターの作成

前記1)で作成した4種のプラスミド(従来型ベクターの配列を持つものと、本発明のベクター配列を持つもの)を、制限酵素で消化した後、フェノール処理とエタノール沈澱で精製し、鋳型DNAとした。この鋳型DNAを用い、第5表に示す反応系で、37℃、2時間、試験管内転写反応を行い、4種の植物ウィルスベクター(RNA)を作成した。作成した植物ウィルスベクター(RNA)は、フェノール処理とエタノール沈澱により精製した。

第 5 表

1 M Tris-HCl (pH=8.0)	4 μ l
1 M MgCl ₂	2 μ l
1 M DTT	1 μ l
10 mg/ml BSA	1 μ l
100 mM ATP	1 μ l
100 mM UTP	1 μ l
100 mM CTP	1 μ l
10 mM GTP	2 μ l
10 mM CAP	20 μ l
鋳型DNA (0.5 mg/ml)	10 μ l
T7ポリメラーゼ	1 μ l
〔宝酒造(株) 50Units / μ l〕	1 μ l
RNaseインヒビター	
〔宝酒造(株) 50Units / μ l〕	55 μ l
H ₂ O	
計	100 μ l

作成した植物ウィルスベクター (RNA) と、公知の方法〔Frankel-Conrat, H., Virology, 4, 1 ~ 4 (1957)〕により精製したタバコモザイクウィルスの野生型外被タンパク質とを、第 6 表に示すの組成にて、20℃で15時間反応させることによって、試験管内で人為的に粒子形成を行った。反応溶液は、そのまま植物ウィルスベクター粒子溶液として使用した。

第 6 表

植物ウィルスベクター (RNA) (0.3 μ g/ μ l)	8 μ l
野生型外被タンパク質 (10 μ g/ μ l)	10 μ l
0.2 M リン酸バッファー (pH = 7.0)	18 μ l

3) 植物ウィルスベクター粒子の接種による植物個体内への外来遺伝子の導入

前記 2) で作成した植物ウィルスベクター粒子溶液を 10 mM リン酸バッファー (pH = 7.0) によって 100 倍に希釈し、カーボランダム (ナカライテスク社製、Carborundum, 600mesh) を用いて、播種後 6 週令のサムソン種タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) の葉に、100 μ l ずつ塗擦接種した。

4) 植物個体内における植物ウィルスベクターの複製と上葉への移行の確認

(1) サンプルの調製

植物ウィルスベクター粒子を感染させてから 15 日後に、同一個体内の感染葉及び非感染葉各々から 10 mg の切片を切り取った。第 7 表に示す組成の SDS サンプリングバッファー 50 μ l を加え、ホモジナイズした後、100°C で 3 分間処理した。冷却した後、12,000 rpm で 5 分間、遠心分離を行い、上清を SDS 化タンパク質サンプルとした。

第 7 表

S D S サンプリングバッファー組成	
T r i s - H C l (p H = 6 . 8)	1 2 0 m M
S D S	4 %
2 - メルカプトエタノール	1 0 %
グリセロール	2 0 %
B P B	0 . 0 0 2 %

(2) 各サンプル中の植物ウィルスベクターの検出

植物ウィルスベクターの存否は、野生型外被タンパク質及び融合タンパク質の有無によって判断した。前記(1)で調製したS D S 化タンパク質サンプル1 μ l を、S D S - P A G E (12.5%ポリアクリルアミド)にかけ、タンパク質を分離した。分離したタンパク質をゲルから電気式ブロッティングによりP V D F 膜へと転写した。次に、抗タバコモザイクウィルスウサギ血清をT B S 緩衝液〔T r i s - H C l (p H = 7 . 6) 2 0 m M 及びN a C l , 1 3 7 m M〕で64,000倍希釈したものを一次抗体染色液とし、ウサギ抗体用ブロッティング検出キット(アマシャム社製)を用いて、添付説明書に従い、抗体染色を行った。結果を図5に示す。

融合タンパク質のみを産生する従来型植物ウィルスベクター(比較例1)は、感染葉中では検出されたが、非感染葉への移行は認められなかった(図5の1, 2)。

一方、野生型外被タンパク質と融合タンパク質とを同時に産生するようにリードスルー配列を導入した本発明の植物ウィルスベクター(実施例1~3)は、感染葉と非感染葉の両方において検出され、

葉から葉へと移行している（全身感染性を持つ）ことが確認された（図5の3～8）。

5) 植物個体内におけるACEIの産生の確認

前記4)と同じサンプルを用いて、同様に電気泳動、膜への転写を行い、抗ACEIウサギ血清をTBS緩衝液で128,000倍希釈したものを一次抗体染色液とし、前記4)と同様に抗体染色を行った。結果を図6に示す。

従来型植物ウィルスベクターは感染葉のみに、本発明の植物ウィルスベクターは感染葉及び非感染葉の両方において、融合タンパク質の形でACEIを産生していることが確認された。

6) 植物ウィルスベクターの融合タンパク質生産能の比較

前記(2)と同様に行い、実施例1～3の植物ウィルスベクターの融合タンパク質生産能を比較した。

その際、SDS-PAGEにかけるサンプルは、感染葉から抽出し、生葉0.2mg相当量として揃えた。また、同時にタバコモザイクウィルス野生型外被タンパク質スタンダード100,75,50,25,10,5ngもSDS-PAGEにかけた。検出は4)の(2)と同様、抗タバコモザイクウィルスウサギ血清による抗体染色によって行った。その結果を図7に示す。

図7におけるバンドの濃さを比較し、それぞれのベクターの融合タンパク質生産量を算出したところ、タバコの葉1gあたり実施例1のベクターは0.025mg、実施例2のベクター及び実施例3のベクターは0.25mgの融合タンパク質を生産していた。このことから、外被タンパク質遺伝子の3'末端の塩基配列をUからA、あるいはUCUからCAAに置換することによって、リードスルー効率が向上し、融合タンパク質生産能が10倍に増大していることが判った。

実施例 4.

実施例 1 で作成した ACE I 配列を持つ本発明の植物ウィルスベクター粒子溶液を、播種後約 6 ヶ月のミニトマトの〔シュガーランプ種、サカタのタネ（株）から購入〕葉に感染させた。感染は、実施例 1 と同様に行った。14 日後にトマトの実を収穫し、トマトの実から抽出したタンパク質サンプル中の ACE I を、実施例 1 と同様にして、抗 ACE I 抗体を用いて検出した。結果を図 8 に示す。

図 8 から明らかなように、トマト実中で ACE I が産生されていることが確認された。

作成されたトマトの実は、経口摂取による血圧低下作用を有する ACE I を多量に含有しているものと期待される。

実施例 5.

1) 植物ウィルスベクターの接種による植物個体への外来遺伝子導入

実施例 2 で作成した ACE I 配列を持つ本発明の植物ウィルスベクター粒子溶液を、播種後 6 週令のサムソン種のタバコの葉に感染させた。感染は、実施例 1 または 2 と同様に行った。

2) 外来遺伝子導入植物個体からの植物ウイルス粒子の採取

感染させてから 1～2 か月後に、感染植物個体の葉 10 g からウイルス粒子を精製した。具体的には、以下の通りである。

感染タバコの非感染葉を凍結後ミキサーで粉碎する。ついでチオグリコール酸を 0.1% 含む 0.1 M リン酸バッファー (pH = 7.0) を粉碎した非感染葉に等重量加え、ホモジナイズした後低温で低速遠心 (8000 × g, 10 分) する。沈澱を捨て、上清の液量に対して 0.06 倍量の 2 M 塩化ナトリウム溶液と 0.2 倍量の 20% ポリエチレングリコール溶液を加え、1 時間氷上に放置する。

ついで低速遠心を行い沈澱を回収する。沈澱を蒸留水に良く分散

後低速遠心と高速遠心（ $100000 \times g$ ，50分）の交互による分画遠心を2回繰り返す。最後の高速遠心の沈澱を蒸留水に懸濁させることによって、ウイルス粒子を得た。

ウイルス粒子の濃度は、波長280nmに対する吸光度の値から10mg/mlと算出された。また、上記の分離、精製に要した日数は約1日であった。

3) ウイルス粒子の純度評価

ウイルス粒子5 μ lに第7表に示した組成のSDSサンプリングバッファーを5 μ l加え、100℃、5分処理したものをSDS化タンパク質サンプルとした。SDS化タンパク質サンプル2 μ lをSDS-PAGE（12.5%ポリアクリルアミドゲル）にかけ、ゲルをクーマシーブリリアントブルー染色し、7.5%酢酸-5%メタノールで脱色後乾燥した。結果を図9に示す。

図9から明らかなように、野生型外被タンパク質と融合タンパク質に対応するバンドのみが検出されており、植物体由来の他のタンパク質をほぼ完全に除去できた。

4) ウイルス粒子中の融合タンパク質の検出

前記3)と同様にSDS化タンパク質サンプルを調製し、その10倍希釈したもの2 μ lをSDS-PAGE（12.5%ポリアクリルアミドゲル）にかけタンパク質を分離した。分離したタンパク質をゲルから電気式ブロッティングによりPVDF膜に転写した。

つぎに、抗TMVウサギ血清又は抗ACEIウサギ血清を一次抗体染色液とし、ウサギ抗体用ブロッティング検出キット（プロメガ社製）を用いて添付説明書に従い抗体染色を行った。結果を図10（a），（b）に示す。

ウイルス粒子に取り込まれている融合タンパク質と野生型外被タンパク質の量比を算出したところ、およそ1：20であり、植物体

から分離、精製したタンパク質中の量比とほぼ一致した。このことは、融合タンパク質が効率よくウイルス粒子に取り込まれていることを示している。

また、非感染葉のウイルス粒子が融合タンパク質を有していることから、リードスルー型ベクターを用いれば、融合タンパク質を含むウイルス粒子が植物個体全体から採取できることが分かった。

産業上の利用可能性

以上の様に、本発明の植物ウィルスベクターは、全身感染性という大きな利点を有しているため、植物個体への有用な性質の導入及び植物体全体での外来遺伝子産物の生産が可能となる。

また、本発明の方法により、外来遺伝子産物を高純度で、再現性良く、安価で、簡便に分離、精製することができる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 66

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

GACCTCTGCA CCTGCATCTA GATTCTTCGT TGCTCCTTTT CCTGAAGTAT 50
TCGGTAAGTA AATGCA 66

配列番号 : 2

配列の長さ : 59

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTTACTTACC GAATACTTCA GGAAAAGGAG CAACGAAGAA TCTAGATGCA 50
GGTGCAGAG- 59

配列番号 : 3

配列の長さ : 75

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

GACCTCTGCA CCTGCATCTT AGCAATTAAG ATTCTTCGTT GCTCCTTTTC 50
CTGAAGTATT CCGTAAGTAA ATGCA 75

配列番号 : 4

配列の長さ : 68

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

TTTACTTACC GAATACTTCA GGAAAAGGAG CAACGAAGAA TCTTAATTGC 50
TAAGATGCAG GTGCAGAG 68

配列番号：5

配列の長さ：75

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

GACCTCTGCA CCTGCATCAT AGCAATTAAG ATTCTTCGTT GCTCCTTTTC 50
CTGAAGTATT CGGTAAGTAA ATGCA 75

配列番号：6

配列の長さ：68

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

TTTACTTACC GAATACTTCA GGAAAAGGAG CAACGAAGAA TCTTAATTGC 50
TATGATGCAG GTGCAGAG 68

配列番号：7

配列の長さ：75

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

GACCTCTGCA CCTGCACAAT AGCAATTAAG ATTCTTCGTT GCTCCTTTTC 50
CTGAAGTATT CGGTAAGTAA ATGCA 75

配列番号 : 8

配列の長さ : 68

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

TTTACTTACC GAATACTTCA GGAAAAGGAG CAACGAAGAA TCTTAATTGC 50
TATTGTGCAG GTGCAGAG 68

請 求 の 範 囲

1. 植物ウィルスの外被タンパク質遺伝子の下流に、リードスルーを誘起する塩基配列を介して外来遺伝子が接続されている植物ウィルスベクター。

2. 外被タンパク質遺伝子が、一部の塩基配列を欠損又は置換した外被タンパク質遺伝子である請求項1に記載の植物ウィルスベクター。

3. 前記植物ウィルスが、DNAウィルスである請求項1又は2に記載の植物ウィルスベクター。

4. 前記植物ウィルスが、RNAウィルスである請求項1又は2に記載の植物ウィルスベクター。

5. 前記DNAウィルスがカリモウィルス又はジェミニウィルスである請求項3に記載の植物ウィルスベクター。

6. 前記RNAウィルスがトバモウィルス、プロモウィルス、クモウィルスなどである請求項4に記載の植物ウィルスベクター。

7. 前記RNAウィルスがトバモウィルスである請求項4に記載の植物ウィルスベクター。

8. 前記リードスルーを誘起する塩基配列が、UAGCAAUUAもしくはそのDNA型であるTAGCAATTA、UAACAAUUAもしくはそのDNA型であるTAACAATTA、UGACAAUUAもしくはそのDNA型であるTGACAATTA、又はUAGCARYYAもしくはそのDNA型であるTAGCARYYA（配列中、下線は終止コドンを示し、RはA又はGであり、Yは、CまたはUあるいはTである）である、請求項1又は2に記載の植物ウィルスベクター。

9. 請求項1～3, 5, 8のいずれか1項に記載の植物ウィルス

ベクターのDNA配列を含んで成るプラスミド。

10. 請求項1, 2, 4, 6~8のいずれか1項に記載の植物ウィルスベクターの相補DNA及び該DNAを転写するためのプロモーターを含んで成るプラスミド。

11. 前記プラスミドで転写するためのプロモーターがPMプロモーター又はT7プロモーターである、請求項10に記載のプラスミド。

12. 請求項1~8のいずれか1項に記載の植物ウィルスベクターを植物体に接種し、該植物ウィルスベクター中の外来遺伝子を発現させることを特徴とする、外来遺伝子を植物体中で発現せしめる方法。

13. 前記植物体が、カリモウィルスの場合は、カブやカリフラワーなどである請求項12に記載の方法。

14. 前記植物体が、ジェミニウィルスの場合は、トマト、キャッサバ、トウモロコシなどである請求項12に記載の方法。

15. 前記植物体が、トバモウィルスの場合は、タバコ、トマトなどである請求項12に記載の方法。

16. 前記植物体が、プロモウィルスの場合は、コムギ、オオムギなどである請求項12に記載の方法。

17. 前記植物体が、ククモウィルスの場合は、キュウリ、トマトなどである請求項12に記載の方法。

18. 植物体を用いて外来性遺伝子産物を製造する方法であって、

(1) 請求項1~8のいずれか1項に記載の植物ウィルスベクターを植物体に接種し、該植物ウィルスベクター中の外来遺伝子を発現させ、

(2) 前記植物体からウィルス粒子を回収し、そして

(3) 前記回収されたウィルス粒子から外来性遺伝子産物を単離

する、ことを含んで成る方法。

Fig.1

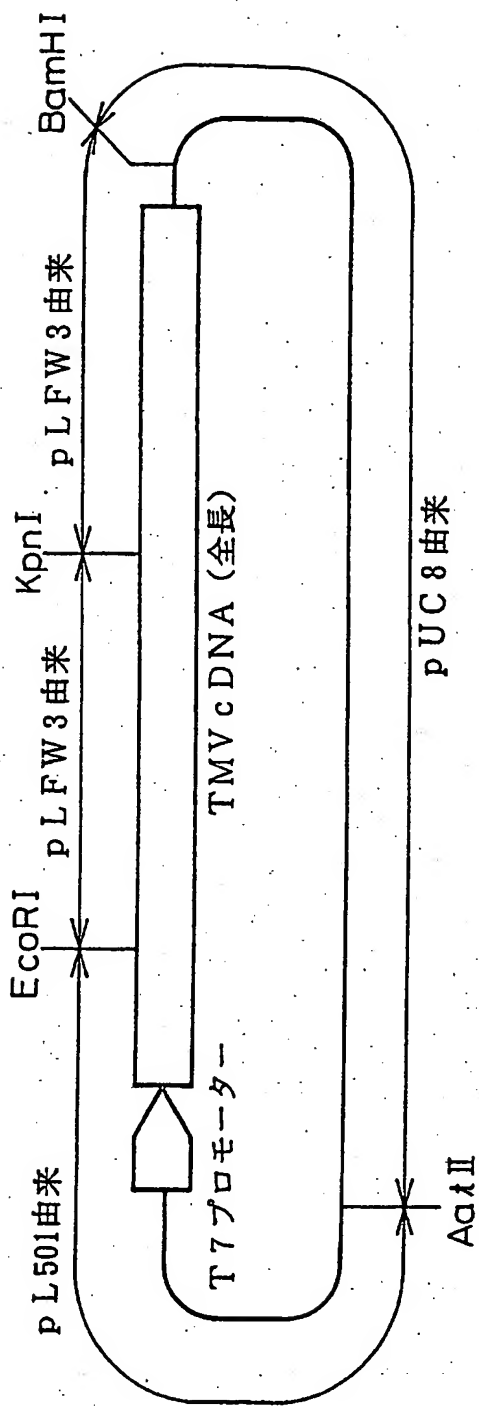


Fig.2

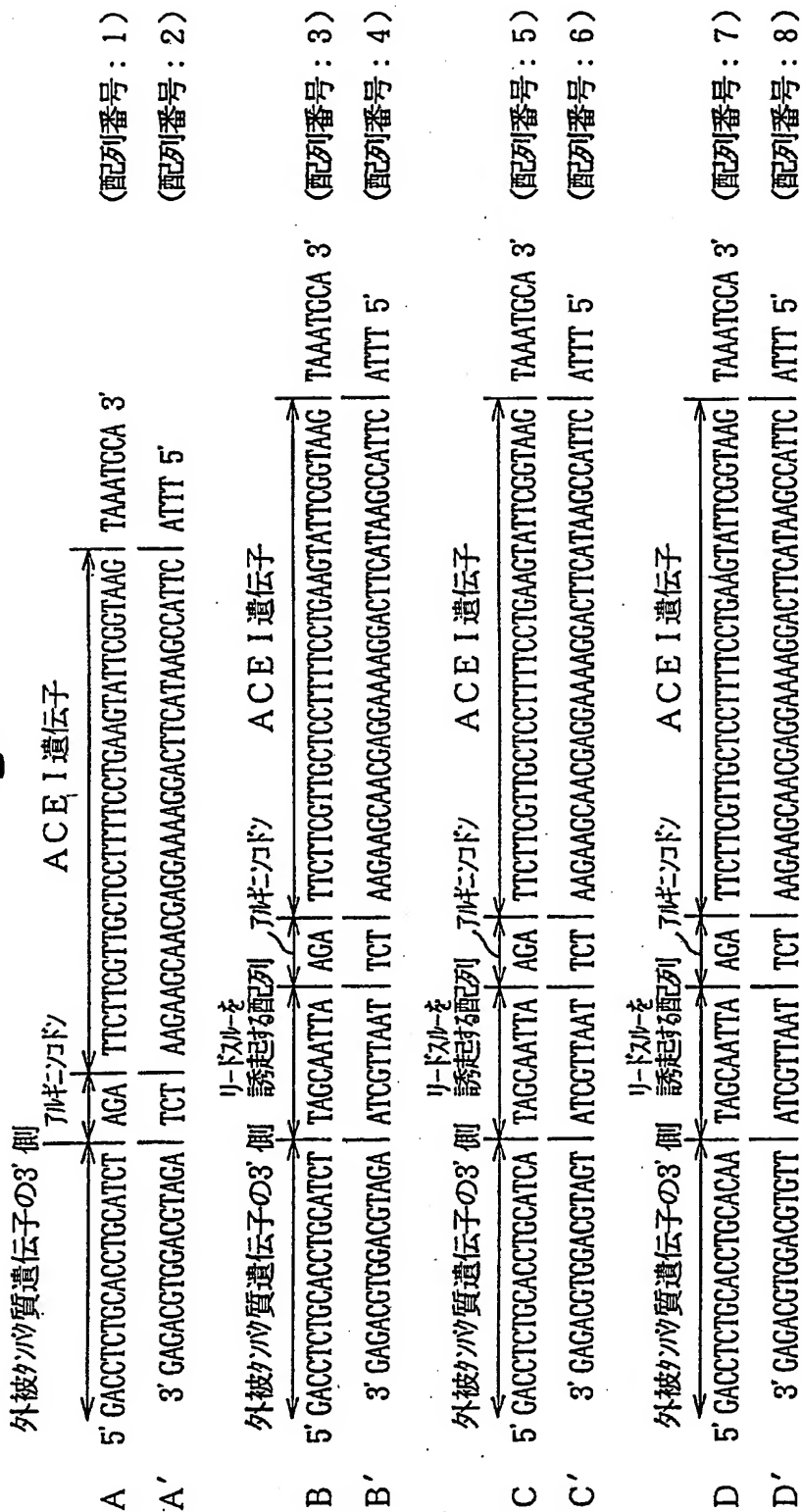
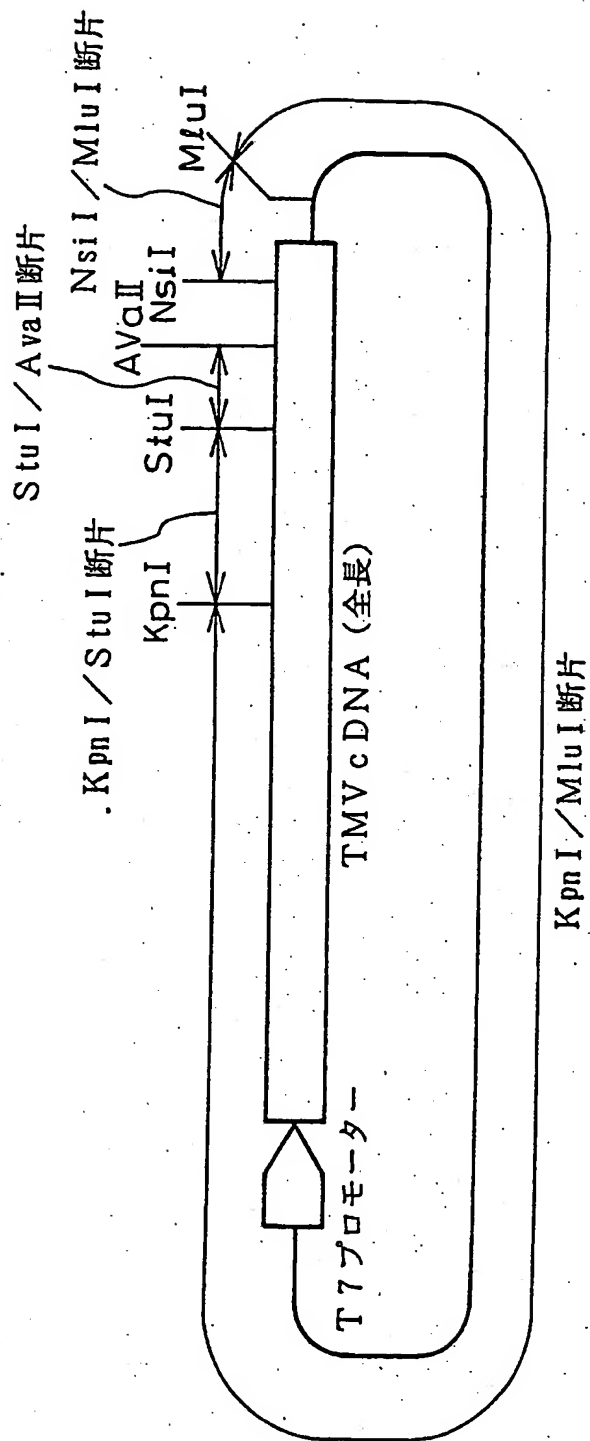


Fig.3



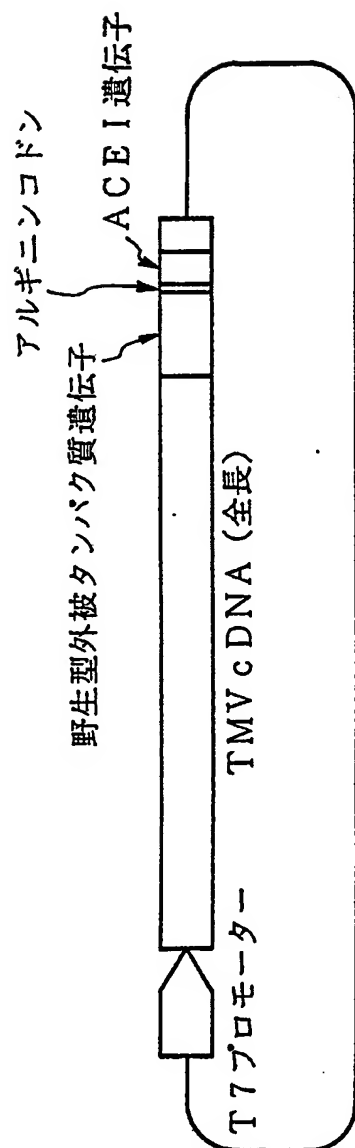


Fig.4(a)

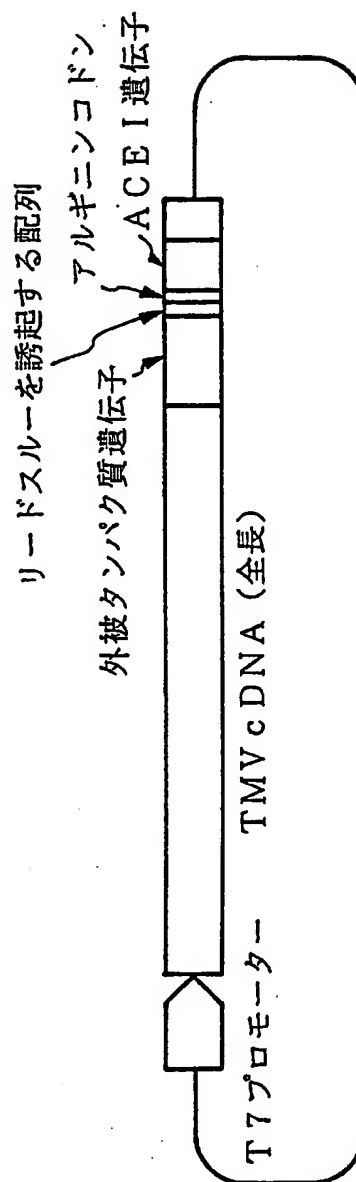
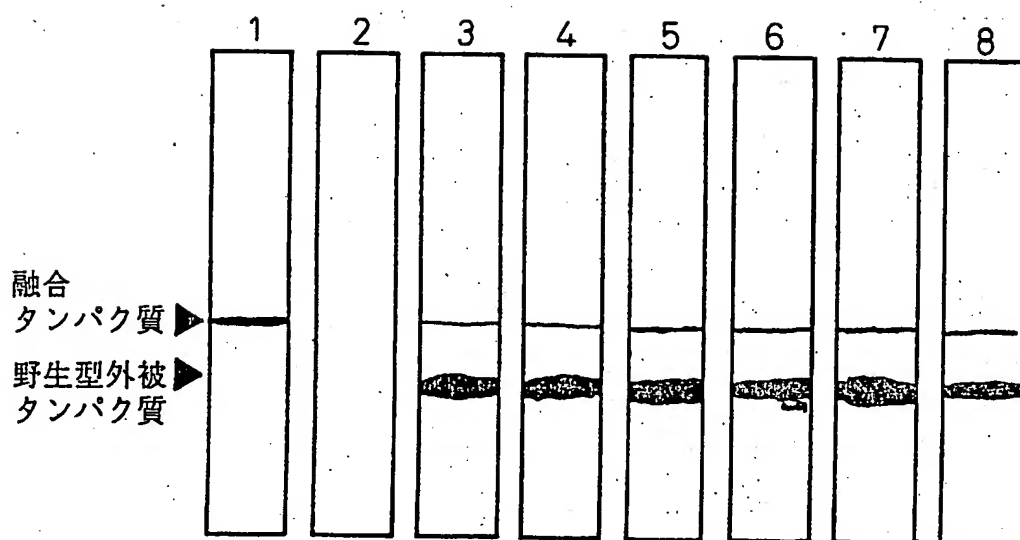


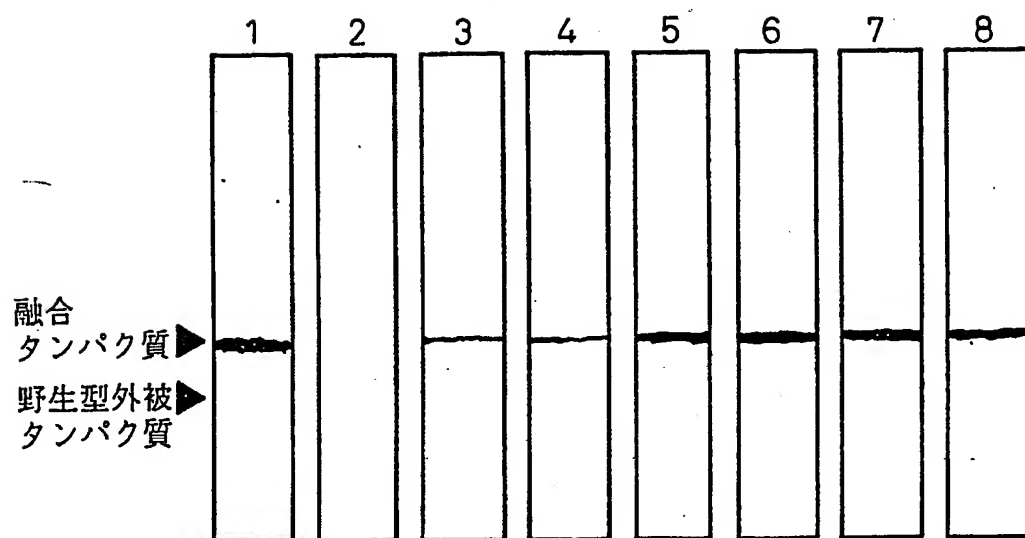
Fig.4(b)

Fig.5



- 1 …従来の直結型ベクター感染葉（比較例1）
- 2 …従来の直結型ベクター非感染葉（比較例1）
- 3 …リードスルー型ベクター感染葉（実施例1）
- 4 …リードスルー型ベクター非感染葉（実施例1）
- 5 …1塩基置換リードスルー型ベクター感染葉（実施例2）
- 6 …1塩基置換リードスルー型ベクター非感染葉（実施例2）
- 7 …3塩基置換リードスルー型ベクター感染葉（実施例3）
- 8 …3塩基置換リードスルー型ベクター非感染葉（実施例3）

Fig.6



- 1…従来の直結型ベクター感染葉（比較例1）
- 2…従来の直結型ベクター非感染葉（比較例1）
- 3…リードスルー型ベクター感染葉（実施例1）
- 4…リードスルー型ベクター非感染葉（実施例1）
- 5…1塩基置換リードスルー型ベクター感染葉（実施例2）
- 6…1塩基置換リードスルー型ベクター非感染葉（実施例2）
- 7…3塩基置換リードスルー型ベクター感染葉（実施例3）
- 8…3塩基置換リードスルー型ベクター非感染葉（実施例3）

Fig.7

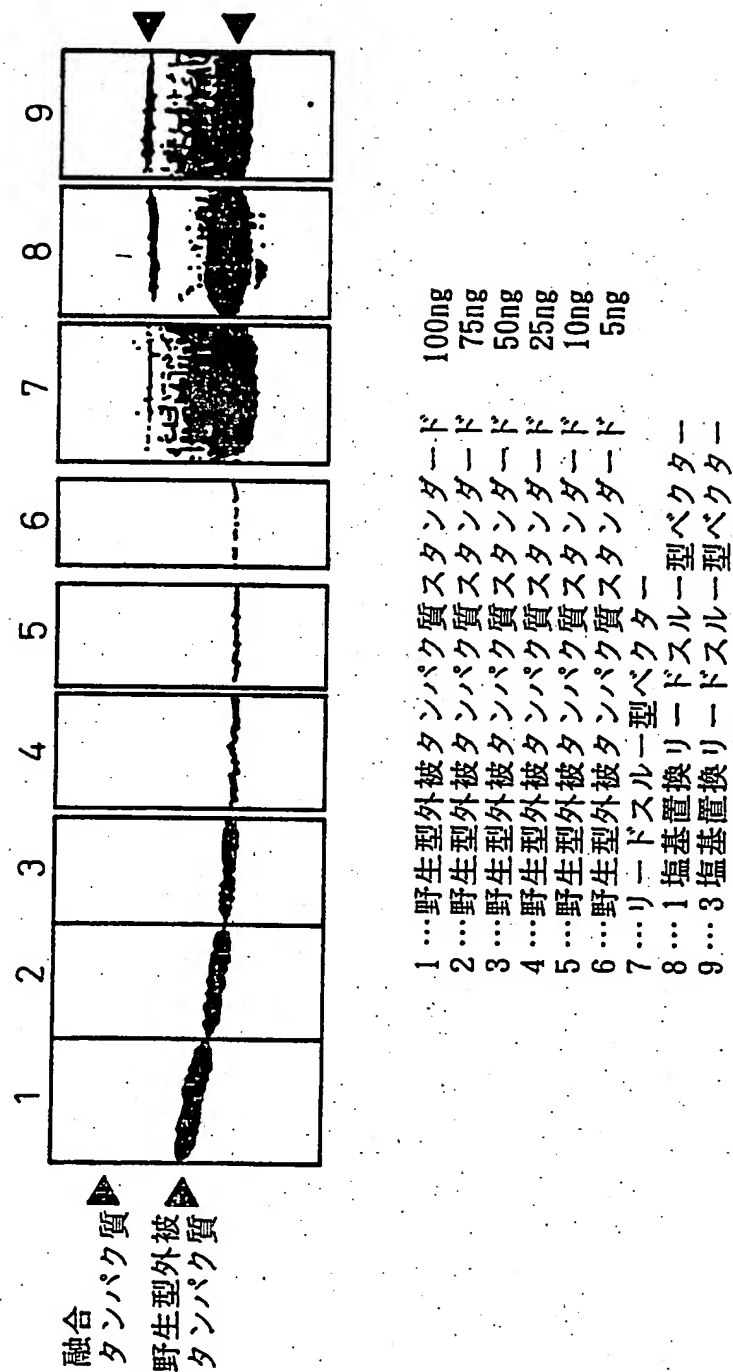
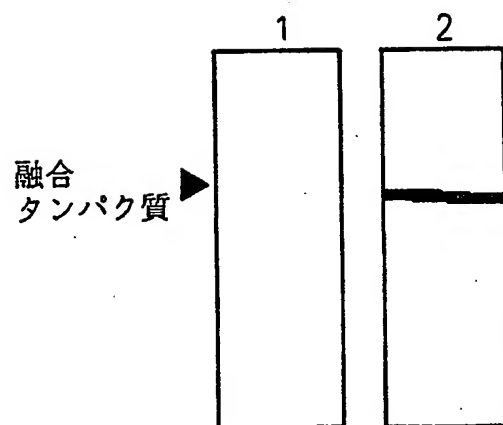


Fig.8



1...非感染トマトの実
2...本発明ベクターを感染させたトマトの実

Fig.9

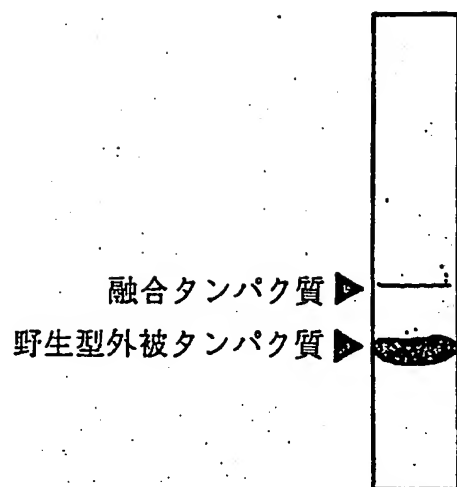
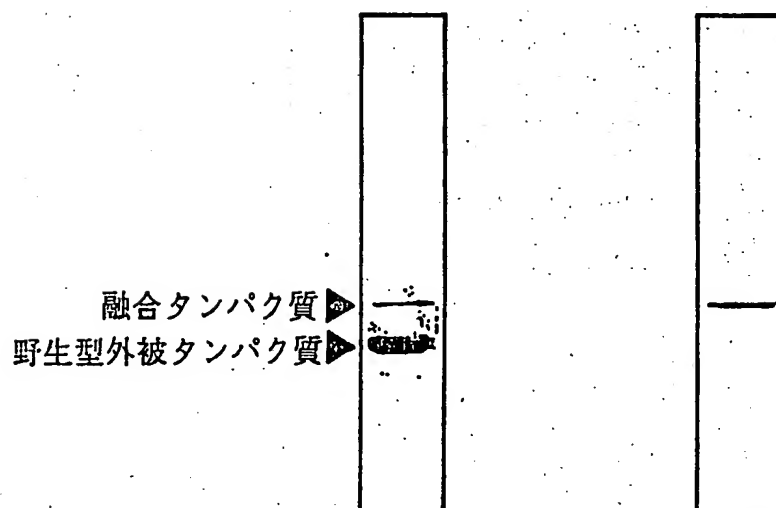


Fig.10(a) Fig.10(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl⁵
 C12N15/83, C12N15/11, C12P21/02//C12N5/10, A01H1/00, A01N3/00,
 (C12P21/02, C12R1:92) (C12N5/10, C12R1:92)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12N15/83, C12N15/11, C12P21/02,
 C12N5/10, A01H1/00, A01N3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PRE VIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of Molecular Biology, Vol. 218, No. 2, 1991, Skuzeski J. M. et al.; "The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons", see p. 365-374.	1-18
Y	Meshi T. et al., "Genetic Engineering with Plant Viruses", 1992, Wilson, T. M. A. et al. (Eds), (Florida, USA), p. 154	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered
to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later than
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority
date and not in conflict with the application but cited to understand
the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such combination
being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 21, 1993 (21. 06. 93)

Date of mailing of the international search report

July 13, 1993 (13. 07. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl.⁸ O12N15/83, O12N15/11, O12P21/02/O12N5/10, A01H1/00, A01N3/00, (O12P21/02, O12R1:92)(O12N5/10, O12R1:92)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ O12N15/83, O12N15/11, O12P21/02, O12N5/10, A01H1/00, A01N3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Journal of Molecular Biology, Vol. 218, No. 2, 1991, Skuzeski J. M. et al. ; " The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons ", see p. 365-374	1-18
Y	Meshi T. et al., [Genetic Engineering with Plant Viruses], 1992, Wilson, T. M. A., et al. (Eds), (Florida, USA), p 154	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.06.93

国際調査報告の発送日

13.07.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4 B 8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線

3448

Try to add w/ Examiner:

****Must go somewhere:**

1. Linking to sites of others----others linking to them-----they pay a fee to link and use their software technology that allows others to link up-----
2. Indexing/retrieving/searching----maybe already included in search engines in class 42
3. Where do databases fit in???

35:

- ♦ providing online business and personal directories.....
- ♦ Can I add the word "commercial" in line 3--"in the fields of business and commerce"
- ♦ Last line: online ordering and retail services in the field of " electronic commerce services in relation to computer hardware and software in the fields of information, business and communications technology and computer multimedia products"
- ♦ Wants to add: "providing on-line sales promotion for others on a global computer network"
- ♦ Wants to add in place of "providing electronic commerce services": providing electronic commerce services in relation to computer hardware and software in the fields of information, business and communications technology and computer multimedia products"
- ♦ Wants to add: "computer services, namely index/ search and retrieve info on computer networks"----think this is 42

38

- ♦ Change: add "images" in two places--"messages and images among computer users....."
- ♦ How can we limit chat and bulletin board service w/out subject matter??---
"concerning electronic commerce services in relation to computer hardware and software in the fields of information, business and communications technology and computer multimedia products"---it just provides the venue for its customers to exchange information???
- ♦ Wants to add: "providing telecommunication connections to a global computer network and to computer databases"
- ♦ Wants to add: "electronic transmission of data, images and documents via computer terminals and networks"----is this new or can I fit it in w/ e-mail services----or already included in those---use "namely"?????
- ♦ Wants to add: "providing multiple-user access to a global computer information network"-----can I do this as a "namely" under electronic mail services????

- ♦ Can indexing/ retrieving and searching be under search engine or can I add it here
- ♦ Change: "daily planner" to "organizer"
- ♦ ADD:-----these are totally brand new, do I need a new application??
 - ♦ Computer services, namely designing and implementing web sites and network web pages for others;
 - ♦ computer services, namely providing databases featuring electronic commerce services in relation to computer hardware and software in the fields of information, business and communications technology and computer multimedia products;
 - ♦ computer services, namely creating, maintaining, and hosting web sites for others;
 - ♦ computer programming for others
 - ♦ Computer software design for others
 - ♦ Leasing access time on a computer database
 - ♦ Providing databases featuring electronic commerce services in relation to computer hardware and software in the fields of information, business and communications technology and computer multimedia products

Talk to examiner---what can add without new application

Pavani is checking on what is absolutely necessary

We will talk Monday evening

I will give her a list of what can be just amended and what is new matter and in what classes so we can make a decision!!!!

If not, can I put them in a separate new application?

If put in an new application, how do you link them....is it really an amendment that you pay a filing fee for or what?????

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)